

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Basel

Direktor: Professor Dr. Gsell

(Arbeit unter Leitung von P. D. Dr. P. Miescher)

Die Bedeutung des Serum-Prothrombingehaltes in der Testung auf antithrombocytaire Antikörper

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Hansjakob SCHMID

von Willisau und Buttisholz (Kt. Luzern)



19

58

Verlag von S. Karger in Basel

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag
von Professor O. Gsell.

Tag der Promotion: 12. März 1958.

**Die Bedeutung des Serum-Prothrombingehaltes in der
Testung auf antithrombozytäre Antikörper**

Auf Grund der Arbeiten von *Harrington* und Mitarb. [16, 17], *Stefanini* und Mitarb. [35] und *Miescher* und Mitarb. [24, 25, 26, 27], steht heute als gesicherte Tatsache fest, daß in gewissen Fällen von idiopathischer Thrombopenie antithrombozytäre Autoantikörper für die Plättchenverminderung verantwortlich sind. In letzter Zeit häufen sich die Berichte über Fälle von primärer und sekundärer Thrombopenie mit positivem Antikörpernachweis [3, 37, 38, 39]. Dabei sind aber die auf Gerinnungsvorgänge zurückzuführenden Fehlerquellen häufig nicht oder nicht voll berücksichtigt worden.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der «Roche»-Studien-Stiftung unter der Leitung von PD Dr. *P. Miescher* durchgeführt.

Zahlreiche Tests sind zum Nachweis antithrombozytärer Antikörper vorgeschlagen worden. Allen in vitro-Techniken ist, mit Ausnahme des Plättchen-Antiglobulintestes [35, 15], gemeinsam, daß aus thrombopenischem Blut gewonnenes Serum oder Plasma mit Blutplättchen oder Plättchenextrakten in Berührung kommt.

Gegen Plättchen gerichtete Antikörper werden naturgemäß in erster Linie in thrombozytenarmem Blut gesucht. Jedes Serum, das aus plättchenarmem Blut stammt, weist, im Gegensatz zu Normalserum, einen hohen Prothrombingehalt auf, und zwar je frischer das Serum, desto höher der Prothrombingehalt. Während schon *Bordet* und *Delage* [15] vom hohen "Serozyme" (= Prothrombin)-gehalt von Serum aus plättchenarmem Vogel- und Kaninchenblut berichteten, klärte vor allem *Quick* [28] 1947 die Frage des verminderten Prothrombinverbrauches bei der Gerinnung von plättchenarmem Plasma und von Hämophilieblut ab. Gemeinsam mit *Shanberge* und *Stefanini* [37] zeigte er den engen Zusammenhang, der zwischen Plättchenzahl und Prothrombinverbrauch bei der Gerinnung besteht. Seine Beobachtungen konnten vielfach bestätigt werden (*Soulier* [34], *Alexander* und *de Vries* [1], *Conley* und Mitarb. [11], *Merskey* [22]).

Als erste wiesen *Stefanini* und *Silverberg* [36] auf die Fehlerquelle des Prothrombins im Nachweis antithrombozytärer Antikörper hin. In jüngster Zeit untersuchte *Lüscher* die Eigenschaften eines Serums, das er aus thrombozytenarmem Plasma gewann, d. h. aus Plasma, aus dem die größte Zahl der Blutplättchen abzentrifugiert worden war. Er konnte feststellen, daß dieses Serum gewaschene Thrombozyten stark agglutiniert [19] und die Retraktion des Gerinnsels hemmt [20]. Die Blutplättchen wurden durch dieses Serum auch im plasmatischen Milieu agglutiniert. Diese Agglutination wurde weder durch nachträglichen Zusatz von Oxalat oder Zitrat noch durch Erwärmen des Serums auf 56° C verhindert [21, 27].

Um immunologische Plättchenreaktionen erkennen zu können, ist es also notwendig, die Rolle der Blutplättchen im Gerinnungsvorgang genauer zu kennen. In seiner interessanten Zusammenfassung der neuesten Ergebnisse nimmt *Lüscher* [19] an, daß alle wesentlichen zur Prothrombinumwandlung führenden Reaktionen auf der Thrombozytenoberfläche ablaufen. Prothrombin selbst konnte von *Bounameaux* [7] in angereicherter Form auf der Plättchenoberfläche nachgewiesen werden. Nach *Bounameaux* [6] befindet sich auf den Thrombozyten, die in dekalkifiziertem Plasma suspendiert sind, immer noch Kalzium. Neuerdings wiesen *Seligmann* und Mitarb. [33] und *Salmon* und Mitarb. [32] Fibrinogen mit Hilfe von immunologischen Methoden in Extrakten von gewaschenen Thrombozyten nach. Aus diesem Befund folgerten sie, daß das Fibrinogen besonders stark mit den Plättchen verbunden sei. *Hasché* [18] machte Ausstriche von plättchenhaltigem Plasma, das durch Zentrifugieren von Na-Zitratblut in nicht silikonierten Röhrchen gewonnen worden war. Mit Hilfe der Mallory-Schueninoff-Färbung konnte er auf vereinzelt auftretenden Plättchenagglutinat Fibrin nachweisen. Er schloß daraus, daß das Fibrin «thrombinfrei»

erzeugt worden war, da ja Antikoagulantien bei der Gewinnung des Blutes beigelegt worden waren. Allerdings muß auch die Möglichkeit erwogen werden, daß die Zitratwirkung nicht ausreicht, um eine Thrombinbildung auf der Plättchenoberfläche zu verhindern.

Wir können also festhalten, daß selbst im ungerinnbar gemachten Plasma oder Blut sich noch Gerinnungsvorgänge an der Oberfläche der Blutplättchen abspielen. In dieser Beziehung ist Serum, das aus einem plättchenarmen Blut gewonnen wurde, besonders aktiv. Bei der immunologischen Testung von Seren auf antithrombozytäre Antikörper dürfen diese Tatsachen nicht außer acht gelassen werden.

Im folgenden berichten wir über eigene Versuche, die zum Ziel haben, die genauen Bedingungen zu erforschen, unter denen es zu einer koagulogenen Thrombozytenschädigung kommt, und für die immunologische Testung einen Weg zu finden, diese koagulogenen Plättchenalterationen auszuschalten.

Methodik

A. Retraktionstest

Unter den zahlreichen Methoden, die zur Messung der Retraktion des Blutkuchens beschrieben worden sind, scheint uns diejenige von Budtz-Olsen [9] die meisten Vorzüge aufzuweisen. Sie schaltet den Einfluß der Glaswand und der Schwerkraft auf die Retraktion [9] aus und zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus. Diese Tatsache erlaubt, relativ geringgradige Unterschiede zwischen 2 Werten als signifikant zu erkennen.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß Blut in einem Milieu gleichen spezifischen Gewichtes in Form einer schwebenden Kugel gerinnt. Das während der Retraktion ausgepreßte Serum wird mit einer Pipette aufgefangen und sein Volumen bestimmt. Aus dem Verhältnis zwischen Serum- und Blutvolumen läßt sich die Retraktion in % berechnen (genaue Technik, siehe Budtz-Olsen).

Wir haben die Retraktionstechnik nach Budtz-Olsen der speziellen Fragestellung unserer Arbeit angepaßt.

Material für die Versuche mit dem Retraktionstest und dem Agglutinationstest.

1. $\text{Na}_2\text{-Sequestren}$, 0,13 Mol. Dinatriumsalzdihydrat der Äthylendiamintetraessigsäure, «Komplexon III, Siegfried», im folgenden als EDTA (Ethylendiamine tetraacetic acid) bezeichnet. Molekulargewicht: 372,2.

2. CaCl_2 0,13 Mol.

3. *Patientenserum*. Es wird steril aufbewahrt, -30°C , und je nach Versuchsanordnung vorbehandelt.

Prothrombin-Adsorption durch BaSO_4 -Behandlung (dabei werden auch Faktor VII, IX, X, Stuart-Faktor etc. mitadsorbiert), 1 g BaSO_4 «Merck» je 10 ml Serum, die Mischung wird mit einem Glasstab gut umgerührt und während 10 Minuten stehen gelassen. Hierauf wird das Serum mit 3000 T/Minute (2800 g), während 30 Minuten abzentrifugiert.

EDTA-Zusatz, 0,5 ml 0,13 Mol. EDTA je 10 ml Serum.

Inaktivierung des Komplements (und des Thrombins). Das Serum wird während 30 Minuten auf 56° C erhitzt.

4. *Thrombozytenreiches Plasma*. Blut wird aus der Armvene gewonnen und in ein silikoniertes Röhrchen aufgefangen, das 0,13 Mol. EDTA enthält (0,3 ml je 10 ml Blut). (Die EDTA-Zusätze zu Serum und Plasma entsprechen den von *Harrington* und Mitarb. [17, 27] für ihren Agglutinationstest angegebenen Mengen.) Hierauf wird das Plasma mit 900 T/Minute (200 g), während 30 Minuten abzentrifugiert. 1–2maliges Nachzentrifugieren des Plasma mit 1200 T/Minute (500 g), während 6 Minuten ergibt ein an roten und weißen Blutkörperchen sehr armes, plättchenreiches Plasma.

5. *Serum aus artifiziell thrombopenischem Plasma (a.T.P.-Serum)*. Aus EDTA-Blut wird, wie beschrieben, Plasma gewonnen. (Es werden nur silikonierte Zentrifugengläser verwendet.) Aus diesem werden die Thrombozyten mit 3000 T/Minute (2800 g), während 45 Minuten herauszentrifugiert. Das plättchenfreie oder plättchenarme Plasma wird rekalkifiziert. Meist genügen 0,6 ml 0,13 Mol. CaCl_2 je 10 ml Plasma (manchmal sind jedoch 0,7–0,8 ml nötig). Das Plasma gerinnt, aber retrahiert nicht (es retrahiert nur partiell, wenn lange Zeit mit einem Glasstab gerührt wird, oder als Folge der Austrocknung). Das geronnene Plasma wird nun in einen Trichter mit Papierfilter verbracht und das abtropfende Serum in einem Behälter aufgefangen. Das Serum wird bei –30° C aufbewahrt und 24–48 Stunden nach der Gerinnung für die Versuche benutzt.

In der Annahme, daß Kalziumchlorid und EDTA im Blut, Serum und Plasma gleichmäßig verteilt seien, müßte dieses a.T.P.-Serum einen Überschuß von 0,3 ml 0,13 Mol. CaCl_2 je 10 ml Serum enthalten. Da äquimolare CaCl_2 und EDTA-Lösungen benutzt werden, lassen sie sich gut miteinander vergleichen.

a.T.P.-Serum

Plättchenhaltiges Plasma	0,3 ml 0,13 Mol. EDTA/10 ml Plasma.
Serum nach der Rekalkifizierung	0,6 ml 0,13 Mol. CaCl_2 /10 ml Serum.
Überschuß an CaCl_2	0,3 ml 0,13 Mol. CaCl_2 /10 ml Serum.

Im Retraktionstest

Plasma	0,3 ml 0,13 Mol. EDTA/10 ml Plasma.
a.T.P.-Serum	0,3 ml 0,13 Mol. CaCl_2 /10 ml Serum.

0

6. *Trichloräthylen* (technisches Produkt, sp. G. 1,47) und *Paraffinöl* (Paraffinum subliquidum, sp. G. 0,885–0,895). 1 Teil Paraffinöl wird mit 0,35 Teilen Trichloräthylen vermischt. Falls in diesem Gemisch ein Plasmatropfen nicht frei schwebt, wird durch Zusatz von Paraffinöl oder Trichloräthylen korrigiert, bis das spezifische Gewicht mit demjenigen des Plasma übereinstimmt.

Retraktionstest: Gleiche Mengen von Serum und thrombozytenreichem Plasma (in unseren Versuchen meist je 1,5 ml) werden in einem silikonierten Röhrchen 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wird rekalkifiziert (0,3 ml 0,13 Mol. CaCl_2 bei 3 ml Gemisch). Nach guter Durchmischung werden 3 ml des Serum-Plasmagemisches mit Hilfe einer graduierten Pasteurpipette

langsam und vorsichtig in eine 37° C warme Paraffinöl-Trichloräthylenlösung gebracht und 4 Stunden dort belassen. Wichtig ist, daß die Lösungen während dieser Zeit immer bei 37° C gehalten werden, da die Retraktion stark temperaturabhängig ist. Dazu ist ein Wasserbad unerlässlich. Ein Wärmeschrank gewährleistet keine genügende Temperaturkonstanz. Nach der 4-stündigen Inkubation wird das Serum, das sich vom Plasma gelöst hat, mit einer Pipette aufgefangen und in einen graduierten Zylinder verbracht. Dabei ist es belanglos, wenn etwas Paraffinöl-Trichloräthylenlengemisch mit aufgesogen wird. Zur genauen Bestimmung der Mengen des ausgepreßten Serums wird Äther in den Meßzylinder geleert und dieser geschüttelt. Der Äther löst alle im Serum schwebenden Paraffin-Trichloräthylen-Kügelchen, und es stellt sich eine scharfe Trennung zwischen Medium und Serum ein, die eine genaue Bestimmung des Serumvolumens gestattet.

Berechnung der Retraktion:

P = Volumen des inkubierten Plasma-Serumgemisches in ml (3 ml)

S = Volumen des ausgepreßten Serums (das im Meßzylinder gemessene Serum) in ml.

Retraktion: $\frac{S}{P} \times 100 = \text{Retraktion in \%}$.

Berechnung der prozentualen Retraktionshemmung eines Serums:

Sk = Kontrollserum,

St = pathologisches Serum.

Prozentuale Retraktionshemmung:

$$100 - \left[\frac{\frac{St}{P}}{\frac{Sk}{P}} \times 100 \right] = 100 - \left[\frac{St}{Sk} \times 100 \right]$$

B. Thrombozytenagglutinationstest

Neben der direkten mikroskopischen Beurteilung des Gemisches von Serum und plättchenhaltigem Plasma, nach Inkubation in silikonierten Röhrchen während 30 Minuten bei 37° C, benutzen wir die von Dausset und Mitarb. 1954 [12] angegebene Technik. Serum und Plasma werden nach der beschriebenen Technik hergestellt. 1 Tropfen Serum und 2 Tropfen plättchenreiches Plasma werden auf eine Glasplatte mit Eindellungen verbracht und während 30 Minuten bei Zimmertemperatur auf dem Kline'schen Apparat geschüttelt. Die Ablesung erfolgt mikroskopisch. Die Wirkungen von pathologischen und von Kontrollseren werden miteinander verglichen.

Wir führten ferner den Agglutinationstest nach Harrington und Mitarb. durch [17, 27]. 0,3 ml inaktiviertes EDTA-Serum und 0,1 ml plättchenreiches Plasma werden sachte durchmischt und über Nacht bei 4° C aufbewahrt. Am nächsten Tag wird eine Teil des Inhaltes in eine feuchte Mikroammer (Objektträger mit runder Vertiefung) gebracht. Darauf erfolgt 30-minütige Inkubation in feuchter Umgebung. Schließlich werden die Objektträger mit dem Kline'schen Agitator (oszillierende

Platte mit 40 Umdrehungen/Minute) während 5 Minuten geschüttelt. Darauf wird die Agglutination mikroskopisch abgelesen.

C. Prothrombinverbrauchstest

Wurde nach der von Biggs und Macfarlane [4] angegebenen Modifikation der Technik nach Quick [28] ausgeführt. Die Menge nicht verbrauchten Prothrombins wird im Prothrombinverbrauchsindex angegeben.

D. Modifizierter Thrombinproduktionstest

1 ml Serum aus dem Blut eines Patienten, der eine Thrombopenie hat, wird mit 1 ml plättchenreichem Plasma 30 Minuten bei 37° C inkubiert (das Patientenserum wird nicht vorbehandelt). Aus Fibrinogenpulver «Roche» wird eine 0,1%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und mit 0,1 Mol. Na-bikarbonatlösung auf $p_H = 7,2$ eingestellt. Von dieser Fibrinogenlösung werden in 10 kleine Teströhrchen je 0,4 ml gebracht und in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert. Von dem im Wasserbad gehaltenen Serum-Plättchen-Plasma-Gemisch werden in Abständen von je 5 Minuten 0,1 ml in ein Röhrchen mit 0,4 ml der Fibrinogenlösung gebracht und die Gerinnungszeit bestimmt. Anhand einer Thrombin-Fibrinogen-Verdünnungskurve läßt sich das freiwerdende Thrombin in Thrombineinheiten in Funktion der erhaltenen Gerinnungszeiten ausdrücken (siehe Biggs und Macfarlane [4]).

Ergebnisse

A. Bestimmung der Fehlergrenzen der Retraktionstechnik.

1. Retraktion mit 2 ml Blut und 1 ml Serum.

a) Die Abweichungen der Methode: Wir machten mit dem Serum eines Spenders 14 Retraktionsversuche und berechneten die Standardabweichung σ nach der Formel:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum [x]^2 - \bar{x} \sum [x]}{N - 1}}$$

N = Anzahl der Retraktionsbestimmungen

x = Retraktion in %

$\bar{x}$ = Mittelwert, arithmetisches Mittel aus der Summe der Einzelwerte.

Im speziellen Fall war $N = 14$, $\bar{x} = 43,0$. Die Standardabweichung σ betrug 2,63. Wird für den Normalbereich $\bar{x} \pm 2 \sigma$ genommen, womit 95% aller Variationen innerhalb dieses Bereiches erfaßt werden, so ergibt sich eine Retraktion von $43 \pm 5,26\%$.

b) Der eigentliche Normalbereich: Da beim Retraktionstest immer Seren verschiedener Spender miteinander verglichen werden, muß der Normalbereich weiter gefaßt werden. Zu diesem Zweck haben wir das Serum von 10 gesunden Spendern geprüft. Im speziellen Fall* wurde als Mittelwert $\bar{x}$: 60,5% gefunden mit einer

* Die von einem Versuch zum anderen verschiedenen Werte beruhen darauf, daß die Thrombozyten für das Ausmaß der Retraktion ausschlaggebend sind. Jeder Versuch wird aber mit anderem thrombozytenhaltigen Plasma durchgeführt.

Standardabweichung von 5,27%. $\bar{x} \pm 2\sigma$ betrug also bei der Testung von 10 Normalseren $60,5 \pm 10,54\%$.

2. Retraktion mit 1,5 ml Plasma und 1,5 ml Serum.

a) *Die Abweichungen der Methode:* Resultate bei 10 Parallelversuchen mit dem gleichen Serum: Mittelwert $\bar{x} = 80,8\%$. Standardabweichung $\sigma = 3,79$. Normalbereich $80,8 \pm 7,58\%$.

b) *Der eigentliche Normalbereich.* Bei der Prüfung von 10 Seren von gesunden Spendern: Mittelwert $\bar{x} = 64,8\%$. Standardabweichung $\sigma = 5,03$. Normalwert $64,8 \pm 10,06\%$.

B. Untersuchungen mit Serum, das aus künstlich thrombopenischem Plasma gewonnen wurde (a. T. P.-Serum).

Die thrombozytenaggressive Wirkung von a. T. P.-Serum wurde in einer für immunologische Untersuchungen typischen Anordnung geprüft. Mehrere Serummengen erhielten verschiedene Zusätze an 0,13 Mol. CaCl_2 oder 0,13 Mol. EDTA, teilweise wurde das Serum mit BaSO_4 vorbehandelt. Je 1,5 ml a.T.P.-Serum wurde mit 1,5 ml plättchenreichem EDTA-Plasma gemischt und in einem silikonierten Röhrchen 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad gehalten. Nach der Inkubation wurde eine kleine Menge des Gemisches im Mikroskop untersucht. Hierauf wurde rekalkifiziert und 3 ml des Gemisches wurde mit der Pasteurpipette in die Paraffinöl-Trichloräthylenlösung zur Bestimmung der Retraktion verbracht. Ablesung nach 4 Stunden.

Aus den zahlreichen Untersuchungen mit a. T. P.-Serum konnten wir Folgendes entnehmen (siehe auch Tabelle I).

1. a. T. P.-Serum besitzt eine manifeste agglutinierende und retraktionshemmende Wirkung.

2. Diese Wirkung kann durch geeignete Mengen an Kalziumionen bis zu einem Optimum verstärkt werden. Wird die optimale Kalziummenge überschritten, tritt Gerinnung ein.

3. EDTA (Na_2 Sequestren) vermindert die agglutinierende und retraktionshemmende Wirkung von a.T.P.-Serum, *hebt sie jedoch nicht vollständig auf.*

4. Erst nach Adsorption des Prothrombins an BaSO_4 und gleichzeitigem Zusatz von EDTA zum Serum werden völlig normale Werte erzielt.

5. Na-citrat vermindert die thromboaggressive Wirkung des a.T.P.-Serums noch weniger als EDTA.

In der folgenden Tabelle seien am Beispiel eines Einzelversuches mit a.T.P.-Serum die angegebenen Ergebnisse illustriert (Tabelle I).

TABELLE I

*Experiment mit a.T.P.-Serum, Gruppe O, 2 Tage alt 1,5 ml Serum +
1,5 ml plättchenreiches Plasma*

Serum	Vorbehandlung des Serums			Nach Inkubation 30 Minuten 37° C	Retraktion nach 4 Stunden	
	ml EDTA/ml Serum	ml CaCl ₂ /1,5 ml Serum	BaSO ₄ - Adsorpt.		Absolute Werte %	Hemmung % (75 = 100%)
a.T.P.	—	0,03	—	geronnen	—	—
a.T.P.	—	0,01	—	Agglutination	11,5	85
a.T.P.	—	—	—	Agglutination	33	56
a.T.P.	0,08	—	—	—	63	16
a.T.P.	—	—	+	Agglutination	45	40
a.T.P.	0,08	—	+	—	76	—
a. plättchenreich	0,08	—	—	—	75	—
Normalserum	0,08	—	—	—	80	—

Aus diesen Versuchen geht ferner hervor, daß der Retraktionstest dem hier verwendeten Agglutinationstest (30minutige Inkubation bei 37° C), überlegen ist.

Zum Begriff «Agglutination»:

Alle in unseren Versuchen beobachteten Plättchenagglomerate werden als «Agglutinationen» bezeichnet, obwohl es sich fast immer um eine echte visköse Metamorphose im Sinne von *Eberth* und *Schimmelbusch* [14], *Budtz-Olsen* [9], *Lüscher* [20], und *Bounameaux* [8] gehandelt hat. Tatsächlich wird heute die visköse Metamorphose der Plättchen, d. h. der Verlust ihrer ovalen oder runden Kontur und die Bildung von pseudopodienartigen Fortsätzen mit einem Gerinnungsvorgang, und die Agglutination, bei der die Thrombozyten ihren morphologischen Aspekt beibehalten, mit einem immunobiologischen oder sonstigen von der Gerinnung unabhängigen Vorgang gleichgesetzt. Diese Interpretation eines morphologischen Vorganges dürfte unseres Erachtens nicht immer möglich sein. Werden zum Beispiel sechsmal gewaschene Thrombozyten unter günstigen pH-Bedingungen mit gereinigtem Thrombin zusammengebracht, so bilden sie Zellhaufen, Agglomerate. Sie scheinen morphologisch nicht verändert, obwohl ihr Zusammenlagern der Ausdruck eines Gerinnungsvorganges ist. Mit Recht wendet *Lüscher* [19] für solche Vorgänge den Begriff Aggregation an. Werden die sechsmal in silikonierten Röhrchen gewaschenen Plättchen mit Serum von Kaninchen zusammengebracht, die mit gewaschenen menschlichen Thrombozyten sensibilisiert worden waren, so beobachtet man oft an den Plättchen Veränderungen, die an eine visköse Metamorphose erinnern.

C. Untersuchungen mit Serum aus Blut von Patienten mit sekundärer Thrombozytopenie.

Wir zeigen das Ergebnis, das mit zahlreichen Seren von Fällen sekundärer Thrombopenie erzielt wurde, an Hand von 2 Beispielen.

1. *Untersuchung mit dem Serum T.* Patient T. litt an einer anerythrämschen Erythrämie (Morbus di Guglielmo). Er wies am Tag der Blutentnahme die Zeichen einer massiven hämorrhagischen Diathese auf mit Epistaxis und ausgedehnter Purpura, speziell über Bauch und Extremitäten. Rumpel-Leede positiv. Hb. 36 %, Erythro 2,18 Millionen. Thrombozyten: 8000/mm³. Prothrombinverbrauch: 20 % (80 % des Prothrombins nicht verbraucht). Blutungszeit: 30', Gerinnungszeit (Lee-White) 20', fehlende Retraktion des Blutkuchens. Knochenmark: Überwiegen der Erythropoese mit zahlreichen Erythroblastennestern. Die Erythroblasten weisen pathologische Zellformen auf (Kern-Plasma-Relation gestört, 2–16 kernige Erythroblasten). Hochgradige Verminderung der Megakaryozyten. Es handelt sich also um einen Fall von sekundärer, d. h. symptomatischer Thrombopenie.

Wir haben die thromboaggressive Wirkung des Serums T, 24 Stunden nach der Entnahme des Blutes, an Hand des schon beschriebenen Agglutinationstestes und des Retraktionstestes geprüft. Das Serum erlitt vor der eigentlichen Testung verschiedene Vorbehandlungen, die in der Tabelle II speziell angegeben sind.

TABELLE II

Versuch mit Serum T. (Serum eines Falles von symptomatischer Thrombopenie)

Vorbehandlung des Serums:				
	EDTA 0,05 ml EDTA/ml	BaSO ₄ 1 g/10 ml Serum	Nach Inkubation 30' 37° C Agglutination	Retraktion %
Serum T	—	—	+	33
	+	—	—	60
	—	+	+	50
	+	+	—	83
Normalserum	+	—	—	77

2. *Untersuchung mit dem Serum D.* (Es handelt sich um ein 10jähriges Mädchen, bei dem 6 Tage nach Beginn einer Mumpserkrankung die Zeichen einer thrombopenischen Purpura auftraten. Rumpelleede und Kneif-Phänomen pos. Blutungszeit verlängert. Thrombozyten: 300/mm³. Prothrombinverbrauchstest: path., fehlende Retraktion.)

TABELLE III

	EDTA 0,05/1 ml Serum	Adsorption des Prothrombins an BaSO ₄	Nach Inkubation Agglutination	Retraktionshemmung %
Serum D	-	-	++	40
3 Tage alt	+	-	-	50
	+	+	-	84
Normalserum	+	-	-	86

Diese beiden Untersuchungen an Seren, die von nicht immunologisch bedingten Thrombopenien stammen, zeigen, daß Agglutinationen und Retraktionshemmungen auftreten können, die ihre Ursache im Prothrombingehalt des Serums haben dürften.

Wir haben eine größere Anzahl von Seren aus Blut von Patienten mit sekundärer Thrombopenie untersucht mit prinzipiell dem gleichen Resultat. Dabei hat sich gezeigt, daß die thrombozytenaggressive Eigenschaft des Serums nicht genau mit der Thrombozytenzahl des Patientenblutes parallel geht. Wahrscheinlich ist der verminderte Prothrombinverbrauch ausschlaggebend.

Aus den vorliegenden Versuchen drängt sich die Folgerung auf, daß Patientenserum vor der Testung auf immunoaggressive Thrombozytenfaktoren mit EDTA und Bariumsulfat vorbehandelt werden müssen. Bei einem solchen Vorgehen ist es aber wichtig, die Wirkung dieser Maßnahmen auf einen immunologischen Plättchenfaktor zu kennen.

D. Einfluß der BaSO₄-Vorbehandlung auf die Antikörperwirkung eines heterologen Immunserums.

Zur Beantwortung der Frage, ob die BaSO₄-Behandlung eines Serums die Wirkung eines Antikörpers beeinflussen könnte, haben wir Versuche mit Serum von Kaninchen, die mit menschlichen Thrombo-

zyten sensibilisiert worden waren, gemacht. Aus den Ergebnissen mit dem Retraktions- und dem Agglutinationstest geht hervor, daß die BaSO_4 -Behandlung von inaktiviertem Serum die Wirkung des Heteroantikörpers nicht nennenswert beeinflußt. Ohne daß damit bewiesen wäre, daß auch Autoantikörper durch BaSO_4 -Adsorption unbeeinflußt blieben, ist ein analoges Verhalten doch naheliegend.

E. Versuche mit einem modifizierten Thrombinproduktionstest

Bekanntlich dient der Thrombinproduktionstest zur Erfassung von Thrombin, das während der Gerinnung des Blutes freigesetzt worden ist.

Wir haben uns die Frage gestellt, ob die zur viskösen Metamorphose nötigen Thrombinmengen mit diesem Test nachgewiesen werden könnten. Es ist uns nie gelungen, während der Inkubation von Plättchen und Serum aus thrombozytenarmem Blut Thrombin mit Hilfe dieses Testes nachzuweisen. Offenbar ist diese Methode nicht empfindlich genug, um die zur viskösen Metamorphose der Blutplättchen nötigen Thrombinmengen zu erfassen. Im Plasma befindet sich wahrscheinlich kein freies Thrombin.

Diskussion

Der Antikörpernachweis gegen die Blutplättchen stellt zur Zeit eines der heikelsten Probleme in der immunohämatologischen Forschung dar. Beim physiologischen Gerinnungsvorgang werden diese Blutelemente bereits «agglutiniert» und aufgelöst. Die agglutinierende und die retraktionshemmende Wirkung eines aus plättchenarmem Blut stammenden Serums hat immer wieder Anlaß gegeben, die Ursache dieses Phänomens nicht im reichlichen Gehalt des Serums an unverbrauchtem Prothrombin, sondern in einem immunologischen Vorgang zu sehen.

Unsere Versuche haben deutlich gezeigt, daß 1–4 Tage altes Serum, welches aus thrombozytenarmem Blut (von Patienten mit einer Thrombopenie oder aus künstlich plättchenarmem Plasma) stammt, thrombozytenaggressive Eigenschaften aufweist, d. h. Blutplättchen morphologisch und funktionell zu schädigen vermag. Abhängig vom Kalziumspiegel solcher Seren kommt es zu einer mehr oder weniger heftigen «Agglutination» von Blutplättchen, bei genügend hohem Kalziumspiegel zu einer eigentlichen «viskösen Metamorphose», was

eine «Immunolyse» der Thrombozyten vortäuschen könnte. In Übereinstimmung mit den Feststellungen von *Lüscher* [21, 27] vermag Natriumzitrat- oder Oxalat diese Vorgänge an den Plättchen nicht ganz zu verhindern. Na_2 -Sequestren ist in dieser Hinsicht wirksamer, aber auch damit werden die thrombozytenaggressiven Vorgänge nicht ganz aufgehoben. Die funktionelle Schädigung kommt in einer Retraktionshemmung deutlich zum Ausdruck. Auch diese Wirkung wird durch Natriumsequestren nicht ganz aufgehoben. Erst die Adsorption des Serums mit Bariumsulfat hebt, zusammen mit Natriumsequestren, diese thrombozytenaggressiven Eigenschaften auf. Die thrombozytenaggressive «koagulogene» Wirkung kommt besonders stark bei frischen aus thrombozytenarmem Blut gewonnenen Seren zum Ausdruck. Durch wochenlanges Lagern in gefrorenem Zustand verschwindet sie allmählich.

Nachdem *Seligmann* und Mitarb. [33] und *Salomon* und Mitarb. [32] Fibrinogen in Plättchenextrakten nachweisen konnten, liegt es nahe, die thrombozytenaggressive Wirkung von Serum, das aus plättchenarmem Blut stammt, folgendermaßen zu deuten: Auf der Thrombozytenoberfläche werden kleine Mengen von Prothrombin in Thrombin übergeführt. Dieses führt zu einer Fibrinbildung des Plättchenfibrinogens. Wir haben Thrombozytenagglutinate, die durch die erwähnten Seren entstanden sind, auf Objektträger ausgestrichen, fixiert und histochemisch auf Fibrin untersucht. Auf zahlreichen Agglutinaten konnten wir Fibrin nachweisen. Denken wir an den morphologischen Aspekt mit der Bildung von Pseudopodien und Fibrinfäden, die die einzelnen Plättchen miteinander verbinden und unter dem Mikroskop häufig als flottierende Plättchenkette sichtbar sind, so erscheint die Auffassung, daß der Angriffspunkt an den Plättchen deren Fibrinogengehalt sei, noch wahrscheinlicher. Wie dies schon *Quick* und Mitarb. [29, 30] und *De Robertis* und Mitarb. [13] zeigen konnten, stellten auch wir fest, daß die Blutplättchen durch Thrombin, nicht aber durch Prothrombin agglutiniert werden (unter der Voraussetzung, daß sich die Plättchen in einem Milieu befinden, dessen pH dem des Blutes entspricht). Ob Thrombin auch unabhängig vom Fibrinogengehalt der Blutplättchen thrombozytenaggressive Eigenschaften besitzt, muß noch abgeklärt werden. *Alexander* und Mitarb. [2] konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß auch Plättchen eines Patienten, der eine kongenitale Afibrinogenämie aufwies, durch Thrombin agglutiniert wurden. Es ist aber möglich, daß mit empfindlichen, immunochemischen Methoden auch an diesen Plättchen noch Spuren von Fibrinogen nachgewiesen werden können [33].

Was für *praktische Folgerungen* lassen sich nun aus den gemachten Feststellungen für die Plättchenserologie ziehen?

Zuerst soll darauf aufmerksam gemacht werden, wie leicht fälschlicherweise Thrombozytenantikörper diagnostiziert werden können. Routineteste, die dieser Lage nicht Rechnung tragen, sind abzulehnen. Vor der Testung eines Serums auf antithrombozytäre Anti-

körper sollten die Kalziumionen, das Prothrombin und eventuell vorhandenes Thrombin entfernt werden. Die Kalziumionen können entweder durch Ionenaustauschharze (z. B. Dowex oder Amberlite IRC-50) oder durch Natriumsequestren, das ebenfalls einen Ionenaustauscher darstellt, aber im Gegensatz zu den erstgenannten Stoffen in gelöstem Zustand im Serum bleibt, unwirksam gemacht werden. Das Prothrombin kann durch Adsorption an Bariumsulfat entfernt und der Prothrombingehalt nach der Adsorption mit Hilfe des Prothrombinkonsumptionstestes geprüft werden. Das Thrombin schließlich wird durch kurzes Erhitzen auf 56° C inaktiviert. Praktisch empfiehlt sich z. B. folgendes Vorgehen:

1. Kurzes Erhitzen des Serums auf 56° C (oder Aufbewahrung 15 Minuten lang bei 37° C und anschließend 45 Minuten bei 4° C).

2. 0,1 g Bariumsulfat je ml Serum wird zugegeben und mit dem Glasstab gut gerührt. Nach 10 Minuten wird das Bariumsulfat wieder wegcentrifugiert.

3. Natriumsequestrenzusatz: 0,5 ml einer 0,13 Mol.-Lösung je 10 ml Serum.

Ergibt die Testung auf antithrombozytäre Antikörper nach der Vorbehandlung des Serums positive Resultate, dann sollte die immunologische Natur des Antikörpers durch Absorptionsversuche an Thrombozyten (siehe *Miescher* [26]) weiter unter Beweis gestellt werden.

Schließlich ist vor einer allzu heftigen Manipulation der Thrombozyten, auch in silikonierten Glasgefäßen, zu warnen. Auch die Läsion von Thrombozyten durch die Glasoberfläche vermag die visköse Metamorphose einzuleiten und eine Immunoagglutination vorzutäuschen. Bei der Durchführung des Agglutinationstestes nach Harrington mit Normalseren haben wir wiederholt Agglutinationen beobachtet. Das gleiche gilt, wenn auch in vermindertem Maße, für den Test nach *Dausset* (siehe unter Methodik). In entsprechenden Versuchen gelang es, Fibrin an der Oberfläche solcher mit Normalserum entstandener Plättchenagglutinate nachzuweisen. Bei einer immunologisch bedingten Plättchenagglutination kommt es aber nicht zu einer Fibrinbildung.

Zum Schluß sei nochmals erwähnt, daß der Retraktionstest empfindlicher als der Agglutinationstest ist. Dazu kommt, daß mit dem Retraktionstest sehr wahrscheinlich auch inkomplette Antikörper erfaßt werden können, das heißt Antikörper, die sich wohl an die Thrombozyten anlagern, jedoch zu keiner Agglutination führen.

Zusammenfassung

Im Nachweis antithrombozytärer Iso- und Autoantikörper gibt es eine Anzahl von Fehlerquellen, die oft nicht berücksichtigt werden, was zu einer verfälschten Auffassung über das Vorkommen solcher Antikörper führt. Die vorliegende Arbeit behandelt die durch Gerinnungsfaktoren bedingten (= koagulogenen) Störfaktoren. Die Thrombozytenwirkung von Seren, die aus sekundär plättchenarmem Blut gewonnen worden sind, wird in Agglutinationstesten und im Retraktionstest untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß solche Seren nicht nur zu einer Plättchenagglutination und in Gegenwart von genügend Kalziumionen zur sogenannten viskösen Metamorphose der Blutplättchen führen, sondern auch zu einer verminderten Retraktion des Blutkuchens. Dem Thrombin kommt dabei eine besonders wichtige Rolle zu. Natriumzitrat oder Natriumsequestren vermögen die Wirkung solcher Seren nicht ganz aufzuheben. Erst die Adsorption des Prothrombins durch Bariumsulfat zusammen mit Natriumsequestrenzusatz schaltet die koagulogenen plättchenaggressiven Eigenschaften dieser Seren aus. Die praktischen Auswirkungen dieser Feststellungen auf die Plättchenserologie werden besprochen.

Summary

When looking for antithrombocytic iso-antibodies and auto-antibodies, certain pitfalls must be recognized if a false estimate of the frequency of such antibodies is to be avoided. The present work deals with those sources of error that are related to the coagulation factors. The effect of sera from secondarily thrombopenic blood upon thrombocytes was studied by means of agglutination and retraction tests. It was shown that such sera agglutinate platelets, that they produce so-called viscous metamorphosis in the presence of a sufficient quantity of calcium ions, and that they even inhibit retraction of the blood clot. Thrombin seems to play an important part in these reactions. Sodium citrate or sodium sequestrene can depress the anti-thrombocytic action of such sera, but abolish it altogether; complete inhibition of their action is accomplished by adsorption of prothrombin onto barium sulphate. The practical consequences of these findings for platelet serology are discussed.

Résumé

Des facteurs de coagulation peuvent être des causes d'erreur dans la recherche des iso- ou des autoanticorps antithrombocytaires. L'auteur étudie, au moyen des tests d'agglutination et de rétraction, l'effet de plusieurs sérums provenant de sang thrombopénique provoqué non immunologiquement. Ces sérums agglutinent les plaquettes et, en présence d'une quantité suffisante d'ions de calcium, produisent une métamorphose visqueuse. Ils inhibent la rétraction du caillot. Les anticoagulants comme le citrate ou le séquestrène diminuent l'action thromboaggressive de ces sérums, ils ne l'abolissent pas. Celle-ci est supprimée par l'adsorption de la prothrombine du sérum au sulfate de barium et par l'addition de séquestrène. Les conséquences pratiques de ces constatations sont discutées.

An dieser Stelle sei PD Dr. *L. Holländer*, Leiter des Basler Blutspendezentrums des Schweizerischen Roten Kreuzes, für seine wertvolle Unterstützung dieser Arbeit gedankt.

Literaturverzeichnis

1. *Alexander, B. und de Vries, A.*: A Factor in Serum which Accelerates the Conversion of Prothrombin to Thrombin III. Its Relationship to the Coagulation Defect of Thrombocytopenic Blood. *Blood* 4: 747 (1949).
2. *Alexander, B., Goldstein, R., Rich, L., Le Bolloch, A. G., Diamond, L. R. und Borges, W.*: Congenital Afibrinogenemia. A Study of some Basic Aspects of Coagulation. *Blood* 9: 843 (1954).
3. *Althoff, H. und Werner, H.*: Zur Immunthrombopenie im Kindesalter. *Z. Kinderheilk.* 1957 (im Druck).
4. *Biggs, R. und MacFarlane, R. G.*: Human Blood Coagulation and its Disorders. 2nd edition (Blackwell Scientific Publications, Oxford 1957).
5. *Bordet, J. und Delage, L.*: La coagulation du sang et la génèse de la thrombine. *Ann. Inst. Past.* 26: 739 (1912).
6. *Bounameaux, Y.*: Du rôle du calcium dans l'adhésivité des plaquettes in vitro. *C. R. Soc. Biol.* 149: 817 (1955).
7. *Bounameaux, Y.*: Dosage des facteurs de coagulation contenus dans l'atmosphère plasmatique des plaquettes humaines. *Rev. franç. Et. clin. biol.* 2: 1 (1957).
8. *Bounameaux, Y.*: Sur le mécanisme de la rétraction du caillot et de la métamorphose visqueuse des plaquettes. *Rev. Hémat.* 12: 16 (1957).
9. *Budtz-Olsen, O. E.*: Clot Retraction (Blackwell Scientific Publications, Oxford 1951).
10. *Chevallier, P., Guillot, M., Fiehrer, A. und Pasquier, C.*: Sur le pouvoir coagulant du plasma et du sérum d'hémophile. *Sem. Hôp., Paris* 22: 1607 (1946).
11. *Conley, C. L., Hartmann, R. C. und Morse, W. I.*: The Clotting Behaviour of Human "Platelet Free" Plasma: Evidence for the Existence of a "Plasma Thromboplastin". *J. clin. Invest.* 28: 340 (1949).

12. Dausset, J. und Malinvaud, G.: Normal and Pathological Platelet Agglutinins Investigated by means of the Shaking Method. *Vox Sang.* 4: 204 (1954).
13. De Robertis, E., Paseyro, P. und Reissig, M.: Electro-Microscopic Studies on the Action of Thrombin on Blood Platelets. *Blood* 8: 587 (1953).
14. Eberth, J. C. und Schimmelbusch, C.: Die Blutplättchen und die Blutgerinnung. *Virchows Arch.* 103: 39 (1886).
15. Flückiger, P., Hässig, A. und Koller, F.: Über den Thrombozyten-Coombs-Test. *Schweiz. med. Wschr.* 1953: 1053.
16. Harrington, W. J., Hollingsworth, J. W. und Moore, C. V.: Demonstration of a Thrombocytopenic Factor in the Blood of Patients with Thrombocytopenic Purpura. *J. Lab. clin. Med.* 38: 1 (1951).
17. Harrington, W. J., Minnich, V. und Arimura, G.: The Autoimmune Thrombocytopenias. *Progress in Hematology*, p. 166 (Grune and Stratton, London/New York 1956).
18. Hasché, E.: Zum färberischen Fibrinnachweis. *Acta haemat.* 18: 175 (1957).
19. Lüscher, E. F.: Die physiologische Bedeutung der Thrombozyten. *Schweiz. med. Wschr.* 86: 345 (1956).
20. Lüscher, E. F.: Viscous Metamorphosis of Blood Platelets and Clot Retraction. *Vox Sang.* 1: 133 (1956).
21. Lüscher, E. F.: Persönliche Mitteilung.
22. Merskey, C.: The Consumption of Prothrombin during Coagulation. The Defect in Hemophilia and Thrombocytopenic Purpura. *J. clin. Path.* 3: 130 (1950).
23. Miescher, P.: Immunohämatologie der Thrombozyten und Leukozyten. *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* 7: 170 (1956).
24. Miescher, P. und Miescher, A.: Die Sedormid-Anaphylaxie. *Schweiz. med. Wschr.* 1952: 1279.
25. Miescher, P., Raymond, A. und Vannotti, A.: Thrombopénies thromboclastiques. *J. exp. Med. Surg.* 12: 501 (1954).
26. Miescher, P., Vannotti, A., Cruchaud, S. und Hemmeler, G.: Die Pathogenese der essentiellen Thrombozytopenie. *J. exp. Med. Surg.* 11: 256 (1952); *Helv. med. Acta* 19: 434 (1952).
27. Miescher, P. und Vorlaender, K. O.: Immunopathologie in Klinik und Forschung und das Problem der Autoantikörper (G. Thieme Verlag, Stuttgart 1957).
28. Quick, A. J.: Studies in the Enigma of the Hemostatic Dysfunction of Hemophilia. *Amer. J. med. Sci.* 214: 272 (1947).
29. Quick, A. J.: The Physiology and Pathology of Haemostasis (Henry Kimpton, London 1951).
30. Quick, A. J. und Hussey, C. V.: The Mechanism of Clot Retraction. *Science* 112: 558 (1950).
31. Quick, A. J., Shanberge, J. N. und Stefanini, M.: The Coagulation Defect in Thrombocytopenic Purpura. *J. Lab. clin. Med.* 34: 761 (1949).
32. Salmon, J. und Bounameaux, Y.: Recherches sur l'antigénicité des plaquettes et du fibrinogène bovins. *C. R. Soc. Biol.* 150: 2278 (1956).
33. Seligmann, M., Goudemand, B., Janin, A., Bernard, J. und Graber, P.: Etudes immunochimiques sur la présence de fibrinogène dans les extraits de plaquettes humaines lavées et dans certains extraits leucocytaires. *Rev. Hémat.* 12: 302 (1957).

34. Soulier, J. P.: La consommation de la prothrombine pendant la coagulation du sang veineux et du sang capillaire. Etude de 57 cas. Rev. Hémat. 3: 302 (1948).
35. Stefanini, M., Dameshek, W., Chatterjea, J. B., Adelson, E. und Mednicoff, I. B.: Studies on Platelets IX. Observations on the Properties and Mechanism of Action of a Potent Platelet Agglutinin Detected in the Serum of a Patient with ITP. Blood 8: 26 (1953).
36. Stefanini, M. und Silverberg, J. H.: Studies on Platelets. I. Amer. J. clin. Path. 21: 1030 (1951).
37. Tullis, J. L.: Platelet Antibody Tests in the Diagnosis of Purpura. New Engl. J. Med. 249: 591 (1953).
38. Verstraete, M. und Vandenbroucke, J.: Thrombocytopénies par agglutinines. Revue du problème et présentation de nouveaux cas. Acta haemat. 13: 129 (1955).
39. Weinreich, J.: Thrombocytopenias and Platelet-antibodies. Vox Sang. 2: 249 (1957).

Adresse des Auteurs: Dr. H. J. Schmid, Angensteinerstraße 7, Basel (Schweiz)
